

DOCKET NO.: 259880US0X PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Romain VIVES, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/01234

INTERNATIONAL FILING DATE: April 17, 2003

FOR: ANTI-HIV COMPOSITION, METHOD OF PRODUCTION AND MEDICINAL PRODUCT

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents  
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

**COUNTRY**  
France

**APPLICATION NO**  
02 04926

**DAY/MONTH/YEAR**  
19 April 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/01234. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



---

Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

Customer Number  
**22850**

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 08/03)



PCT/FR03/01234

# BREVET D'INVENTION

REC'D 14 JUL 2003

WIPO

PCT

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 MARS 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

**Best Available Copy**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>19 AVRIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0204926</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>19 AVR. 2002</b>		<b>1. NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> BREVATOME 3 rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) B13987.3/EE BD 1388/CNRS			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2. NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>
<b>3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET MEDICAMENT			
<b>4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5. DEMANDEUR</b>		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public de caractère Scientifique, Technique et Industriel	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Adresse		31-33 rue de la Fédération	
Rue			
Code postal et ville		75752	PARIS 15ème
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE <b>19 AVRIL 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0204926</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI		08 540 W / 260899	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>			B13987.3/EE BD 1388/CNRS		
<b>6 MANDATAIRE</b>					
Nom		AUDIER			
Prénom		Philippe			
Cabinet ou Société		BREVATOME 422.5/S002			
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		7068 du 12.06.98			
Adresse	Rue	3 rue du Docteur Lancereaux			
	Code postal et ville	75008	PARIS		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.53.83.94.00			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.63.83.33			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		brevets.patents@brevaalex.com			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>					
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>			
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>					
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non			
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition.)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>			
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  P. AUDIER 422-5 S/002		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>			

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1...

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

**19 AVRIL 2002**

LIEU

**75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

**0204926**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 W / 260999

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		<b>B13987.3/EE BD1388/CNRS</b>	
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation	N°
		Date	
		Pays ou organisation	N°
		Date	
		Pays ou organisation	N°
		Date	
<b>5 DEMANDEUR</b>			
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	3 rue Michel Ange	
	Code postal et ville	75794 PARIS CEDEX 16	
Pays		FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>5 DEMANDEUR</b>			
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Pays			
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	
P. AUDIER 422-5 S/002			

**COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET  
MEDICAMENT**

**DESCRIPTION**

5

**Domaine technique**

La présente invention se rapporte à une composition anti-VIH et à son procédé de fabrication. Elle se rapporte également à l'utilisation de ladite  
10 composition pour la fabrication d'un médicament anti-VIH.

L'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans la cellule est une étape essentielle du cycle infectieux viral. Ce processus se divise en deux  
15 phases correspondant à l'interaction du virus à la surface cellulaire au niveau de récepteurs spécifiques de l'hôte, et à la pénétration du matériel génétique du virus dans la cellule cible.

Au cours des dix dernières années, les mécanismes  
20 d'adhésion du VIH à la surface cellulaire se sont considérablement clarifiés. Les partenaires moléculaires impliqués sont maintenant bien définis tel qu'exposé dans les documents [1, 2] de la liste de référence annexée.

25 Du côté du virus, les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 constituent la "clef de voûte" du complexe d'interaction virus/cellules. Dans un premier temps, gp120 s'associe avec une protéine transmembranaire de la cellule hôte, CD4. Cette  
30 interaction provoque un changement conformationnel de gp120 qui va exposer un épitope particulier, dit "CD4 induit" (CD4i). CD4i constitue un site de fixation pour

certaines membres de la famille des récepteurs des chimiookines (principalement CXCR4 et CCR5), qui vont jouer un rôle de co-récepteur de gp120 à la surface cellulaire. Cette deuxième interaction gp120/CCR5 ou gp120/CXCR4 provoque alors une réorganisation du complexe protéique gp120/gp41. Cette réorganisation expose gp41 ce qui permet alors l'initiation de la fusion des membranes cellulaires et virales, et l'entrée du matériel génétique viral dans la cellule.

Ces travaux permettent de définir deux nouvelles cibles thérapeutiques : l'inhibition de l'interaction de la gp120 avec CD4 et CCR5 ou CXCR4, et l'inhibition de la fusion [3].

#### 15 **Art antérieur**

Les références entre crochets [] renvoient à la liste de références annexée.

Dans le domaine de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) les trithérapies associant inhibiteurs nucléosidiques, non nucléosidiques et/ou antiprotéases ("HAART" pour "Highly Active Antiretroviral Treatment") ciblent la réplication et la maturation du virus.

Ces traitements permettent une réduction importante de la charge virale, mais ils ne permettent pas une éradication totale du virus dans l'organisme. En effet, l'arrêt de la prise de médicaments, même après plusieurs années de traitement, se traduit invariablement par une remontée rapide de la virémie plasmatique. Outre cet inconvénient, ces traitements présentent une toxicité importante et de nombreux effets secondaires.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements contre le SIDA, les processus d'adsorption du virus sur la cellule hôte constituent une cible thérapeutique particulièrement attractive, du fait  
5 notamment que cette étape se déroule à l'extérieur de la cellule.

Des peptides se liant à gp41 et inhibant son activité de fusion ont été développés [4, 5]. Les études cliniques en cours donnent des résultats  
10 positifs, indiquant que l'inhibition de la fusion, et donc de l'entrée du virus correspond effectivement à une cible thérapeutique intéressante.

Concernant l'attachement du virus, différentes études ont exploré l'utilisation de CD4 soluble pour  
15 inhiber l'interaction du virus avec le CD4 exprimé à la surface des cellules cibles du VIH. Cette solution s'est révélée inefficace, parce qu'en se fixant aux virus, le CD4 soluble expose l'épitope CD4i, et favorise en fait l'interaction du virus au co-récepteur  
20 CCR5 ou CXCR4, ce qui dans certains cas augmente l'infection [6].

En plus de CD4, les co-récepteurs sont aussi des sites d'attachement du virus sur les cellules. Les ligands naturels de ces co-récepteurs sont des  
25 chimiokines, notamment RANTES et MIP pour CCR5, et SDF pour CXCR4. In vitro ou sur des cellules en culture, ces chimiokines inhibent l'interaction du virus avec les cellules [7, 8], mais induisent aussi un certain nombre de réponses cellulaires les rendant difficile à  
30 utiliser d'un point de vue thérapeutique. Un certain nombre de composés tels que l'AMD301 ou des peptides se liant aux co-récepteurs ont aussi des effets anti-



viraux [9,10]. Cependant, en ciblant les co-récepteurs du VIH, ces différentes molécules bloquent également les fonctions intrinsèques de la cellule liée à l'utilisation de ces co-récepteurs.

5        Outre ces récepteurs cellulaires, le VIH est capable de se fixer à d'autres molécules présentes sur les cellules qu'il infecte, telles que DC-SIGN, les sphingolipides ou encore les héparanes sulfates [11].

10        Les héparanes sulfates sont des polysaccharides complexes appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs). Ils sont présents en abondance à la surface cellulaire et dans les matrices interstitielles, où ils sont trouvés ancrés sur le domaine extracellulaire de glycoprotéines  
15        particulières, les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). Découverts il y a un demi-siècle à partir des préparations d'héparine (un autre type de GAG possédant des propriétés très voisines), les HS se distinguent de  
20        toute autre macromolécule biologique par la diversité de leur structure et des fonctions qu'ils exercent. Ils sont capables notamment de fixer la gp120 du VIH, et le virus utilise cette propriété pour s'adsorber à la surface des cellules cibles. Le site d'interaction des  
25        héparanes sulfates sur la gp120 est localisé sur une structure variable, appelée boucle V3 [12]. Néanmoins, le rôle exact de ces polysaccharides au cours de l'infection par le VIH reste peu clair. Des études ont montré que l'élimination des héparanes sulfates  
30        exprimés à la surface des cellules contribuait à rendre celles-ci moins permissives à l'infection par le virus [11] démontrant l'importance de cette molécule pour l'attachement et l'entrée du virus.

Sur la base de ces observations, différentes molécules polyanioniques de type héparine ont été développées pour inhiber l'interaction du virus avec les cellules. Cependant, les premiers essais cliniques  
5 n'ont montré que peu ou pas d'activité de ces molécules, et des effets toxiques ont pu être observés dans certains cas [13, 14].

Il apparaît donc nécessaire de mettre au point de  
10 nouveaux traitements contre le SIDA, moins contraignants, entraînant moins d'effets secondaires et permettant d'éviter les échappements, c'est à dire l'apparition de virus résistants, ne répondant plus aux traitements. Il est en outre nécessaire de trouver  
15 d'autres thérapies contre le VIH dirigées sur de nouvelles cibles.

C'est dans ce contexte que les inventeurs ont réalisé la présente invention.

## 20 **Exposé de l'invention**

La présente invention a précisément pour but de pallier les inconvénients précités en fournissant une nouvelle composition utilisable en tant qu'agent anti-VIH. Cette composition est capable de bloquer l'entrée  
25 du virus du SIDA dans ses cellules hôtes. A ce titre, elle est utilisable pour la préparation d'un médicament, en particulier d'un médicament destiné au traitement du sida.

La composition de la présente invention est  
30 caractérisée en ce qu'elle comprend un polyanion et une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

Ainsi, conformément à la présente invention, les inventeurs ont réunis au sein d'une seule composition d'une part un polyanion, par exemple de type héparine ou héparane sulfate, et d'autre part une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120, par exemple d'un peptide CD4 soluble. Ils ont montré que cette composition permet d'inhiber, de manière inattendue, à la fois l'interaction virus-héparanes sulfatés de membranes cellulaires, en bloquant la boucle V3, et l'interaction virus-co-récepteurs, en bloquant le site CD4i. Les inventeurs ont en effet montré qu'il existe en fait deux domaines ou sites d'interaction des polyanions de type héparine ou héparane sulfate sur la gp120. Le premier est la boucle V3, le second est le domaine CD4i. Ils ont montré (voir exemples ci-dessous) que l'héparine, ou des fragments d'héparine de taille suffisante, en présence d'un peptide CD4, interagit avec le domaine CD4i de la protéine virale gp120 et que cette combinaison inhibe fortement l'interaction gp120/anticorps 48d ou 17b. 48d ou 17b sont utilisés comme mêmes des corécepteurs.

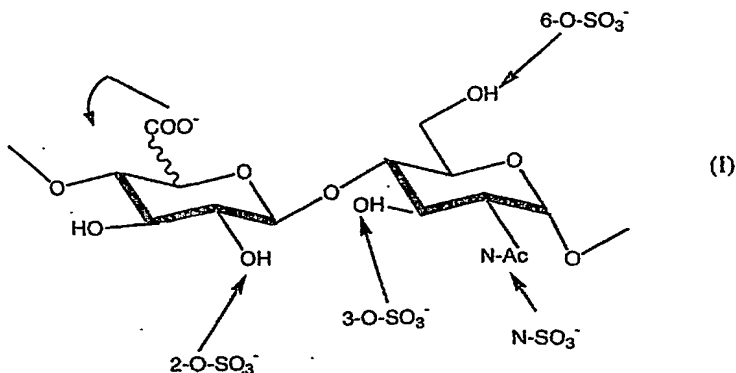
Ce blocage du VIH avec la composition de la présente invention est d'autant plus inattendu que l'homme du métier sait que la molécule CD4 utilisée seule, peut avoir l'effet inverse de celui recherché car elle expose les domaines d'interaction avec les co-récepteurs, et peut donc augmenter l'infectivité par le virus.

La composition de la présente invention vise donc une nouvelle cible thérapeutique au moyen d'héparine ou autres polyanions en présence du peptide CD4, à savoir

le blocage de l'interaction du VIH avec ses co-récepteurs. Cette solution est très intéressante du point de vue thérapeutique pour inhiber l'attachement du virus sur les cellules car elle cible le virus lui-même et non les cellules. Elle est donc au premier  
5    abond dépourvue des effets cellulaires qui sont observés avec les produits de l'art antérieur lorsque ce sont les co-récepteurs qui sont ciblés. En outre la toxicité de la composition de la présente invention  
10   pour un organisme est inférieure à la plupart des composés chimique de l'art antérieur du fait de la nature de ses constituants.

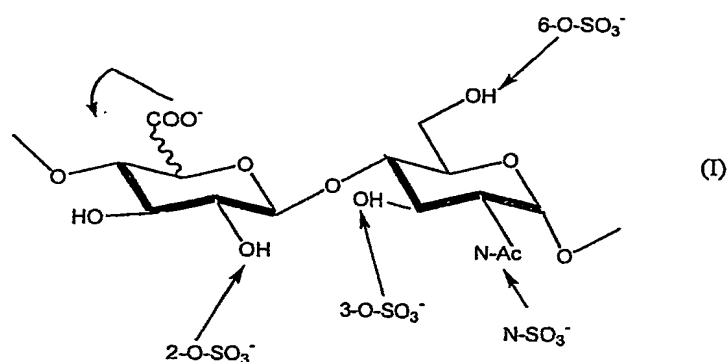
Selon l'invention, le polyanion peut être choisi avantageusement dans le groupe constitué de l'héparine,  
15   de l'héparane sulfate, et d'un polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate. Il s'agit par exemple du Dextran sulfate (marque de commerce, Ueno fine chem), du Curdlan sulfate (marque de commerce, Ajinomoto), du Naphtalene-2 sulfonate polymer (marque  
20   de commerce, Procept), du Pentosan polysulfate (marque de commerce, Baker norton pharm ; Hoechst), ou du Resobene (marque de commerce).

La structure du disaccharide constitutif (élément de base) de l'héparine et de l'héparane sulfate selon  
25   la présente invention est de formule (I) suivante :



Il est préférable que le polyanion ne soit pas trop long, car il aurait une activité anticoagulante, non souhaitée dans la présente invention, et formerait des liaisons aspécifiques avec différentes protéines, notamment la thrombine ou l'antithrombine III. Sa longueur sera de préférence similaire à une chaîne d'héparine ayant un degré de polymérisation tel que défini ci-dessous. Le polyanion présente de préférence au moins deux groupes anioniques par disaccharide. Selon la présente invention, lorsque le polyanion est de l'héparine ou de l'héparane sulfate, il aura de préférence un degré de polymérisation dp de 10 à 24, avantageusement de 12 à 24, de préférence de 16 à 22.

Selon l'invention, le polyanion peut être préparé par dépolymérisation partielle d'héparine ou d'héparane sulfate par une méthode enzymatique, par exemple au moyen d'héparinase, ou chimique, par exemple au moyen d'acide nitreux. Lorsqu'ils sont obtenus chimiquement, les héparanes peuvent être définis par la présence de glucosamine N-sulfatée ou N-acétylée, ou non substituée en position N, liée à un acide uronique (acide glucuronique ou acide iduronique) avec une proportion variable de groupe sulfate. Des mêmes structuraux de



Il est préférable que le polyanion ne soit pas trop long, car il aurait une activité anticoagulante, non souhaitée dans la présente invention, et formerait des liaisons aspécifiques avec différentes protéines, notamment la thrombine ou l'antithrombine III. Sa longueur sera de préférence similaire à une chaîne d'héparine ayant un degré de polymérisation tel que défini ci-dessous. Le polyanion présente de préférence au moins deux groupes anioniques par disaccharide. Selon la présente invention, lorsque le polyanion est de l'héparine ou de l'héparane sulfate, il aura de préférence un degré de polymérisation dp de 10 à 24, avantageusement de 12 à 24, de préférence de 16 à 22. Selon l'invention, l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate peut avoir un degré de polymérisation dp de 12 à 20, par exemple de 15 à 17.

Selon l'invention, le polyanion peut être préparé par dépolymérisation partielle d'héparine ou d'héparane sulfate par une méthode enzymatique, par exemple au moyen d'héparinase, ou chimique, par exemple au moyen d'acide nitreux. Lorsqu'ils sont obtenus chimiquement, les héparanes peuvent être définis par la présence de glucosamine N-sulfatée ou N-acétylée, ou non substituée en position N, liée à un acide uronique (acide glucuronique ou acide iduronique) avec une proportion variable de groupe sulfate. Des mêmes structuraux de

ces oligosaccharides peuvent être obtenus par synthèse chimique.

Selon l'invention, la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 peut être choisie parmi un peptide CD4 ou un  
 5 dérivé de ce peptide, ou encore un anticorps monoclonal se fixant sur la protéine virale gp120 et capable d'activer ladite protéine gp120 de façon équivalente au peptide CD4.

10 Lorsqu'il s'agit d'un peptide CD4, il est de préférence soluble pour les raisons évidentes de faciliter son interaction avec la protéine virale gp120 en milieu liquide, et de faciliter son accès à sa cible.

15 Selon l'invention, avantageusement, le peptide CD4 est de séquence (I) suivante :

20 Cys ou TPA - P<sup>1</sup>- Cys - P<sup>2</sup> - Cys - P<sup>3</sup> - Cys - Ala  
 ou Gln - Gly ou (D)Asp ou Ser - Ser ou His ou Asn  
 - Xaa<sup>J</sup> - Cys - Thr ou Ala - Cys- Xaa<sup>k</sup> - NH<sub>2</sub>

dans laquelle TPA représente l'acide thiopropionique, Xaa<sup>J</sup> représente la β-napthylalanine, la phénylalanine ou la bi-phénylalanine, Xaa<sup>k</sup>  
 25 représente Gly, Val ou Ileu, P<sup>1</sup> représente 3 à 6 acides aminés, P<sup>2</sup> représente 2 à 4 acides aminés et P<sup>3</sup> représente 6 à 10 acides aminés, les acides aminés dans P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> étant naturels ou non naturels, identiques ou différents et P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> ayant ou non une séquence  
 30 commune, ledit peptide présentant une conformation en épingle à cheveux β dont le coude β est formé par les

résidus acides aminés Ala ou Gln - Gly ou DAsp ou Ser-Ser ou His ou Asn- Xaa<sup>j</sup> de sa séquence (A). En effet, ces peptides montrent une très grande affinité pour la protéine virale gp120.

5 Des exemples de tels peptides utilisables conformément à la présente invention sont les peptides de séquences IDn°1 à IDn°18 de la liste de séquences annexée ou des peptides équivalents.

10 Ces peptides peuvent être préparés par les techniques classiques de synthèse chimique en phase solide ou de recombinaison génétique.

Lorsque la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 est un anticorps, il peut être choisi par exemple  
15 parmi ceux décrits dans le document Sullivan N, Sun Y, Binley J, Lee J, Barbas CF 3<sup>rd</sup>, Parren PW, Burton DR, Sodroski J, Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies. *J Virol* 1998 ;  
20 72(8) : pp.6332-6338.

Selon un premier mode de réalisation de la présente invention, le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine  
25 virale gp120 sont mélangés dans ladite composition. Cette composition conforme à la présente invention permet d'exposer le site d'interaction avec les co-récepteurs (site CD4i) et, de façon concomitante, de bloquer ce site par la partie oligosaccharidique  
30 constituée par le polyanion.

Suivant ce premier mode de réalisation, le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition



de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont  
avantageusement mélangés dans ladite composition en des  
proportions de 1 à 10 mole(s) de polyanion pour 0,5 à  
1,5 mole de molécule capable d'induire l'exposition de  
5 l'épitope CD4i de la protéine virale gp120. De  
préférence de 5 moles de polyanion pour 1 mole de  
molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope  
CD4i de la protéine virale gp120.

La présente invention se rapporte également à un  
10 procédé de fabrication de la composition suivant ce  
premier mode de réalisation de l'invention, comprenant  
les étapes suivantes :

- préparation du polyanion,
- préparation de la molécule capable d'induire  
15 l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale  
gp120,
- mélange du polyanion et de la molécule  
capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la  
protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir  
20 ladite composition.

Le mélange sera de préférence réalisé dans un  
tampon biologique pour pouvoir être utilisé pour  
fabriquer un médicament administrable. Le pH est de  
préférence d'environ 7, et la solution contient par  
25 exemple 15g/l de NaCl.

Selon un deuxième mode de réalisation de la  
présente invention, le polyanion et la molécule capable  
d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine  
30 virale gp120 sont liés entre eux dans ladite  
composition. Ils forment un hybride polyanion/molécule

capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

Par exemple, selon l'invention, le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux au  
5 niveau d'une des extrémités du polyanion.

Lorsque le polyanion utilisé est de courte taille, par exemple avec un degré de polymérisation  $dp$  de 10 à 12, il peut être nécessaire de lier le  
10 polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 au moyen d'un bras espaceur, ceci afin de permettre à l'hybride formé de se fixer sur l'ensemble de ses cibles sur la protéine virale gp120. Ce peut être le cas aussi,  
15 lorsque la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 est trop courte. Le bras espaceur peut être tout polymère, de préférence soluble dans les tampons aqueux, de longueur appropriée. On peut citer par exemple les polyosides ou  
20 polyglycols. Il peut s'agir par exemple du polyéthylèneglycol :  $(CH_2CH_2O)_n$ . Des préparations de bras espaceurs de ce type utilisables dans la présente invention ont été décrites largement dans l'art antérieur, par exemple dans les documents [18] et [19]  
25 (voir liste de références annexée).

La présente invention se rapporte également à un procédé de fabrication de la composition selon le deuxième mode de réalisation de l'invention, comprenant les étapes suivantes :

30 - préparation du polyanion,

- préparation de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120,

5       - liaison du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

La liaison du polyanion avec la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i peut être  
10 formée par toutes les techniques connues de l'homme du métier, par exemple pour lier un polyanion et un peptide. Par exemple, les différentes méthodes décrites dans les documents [15], [16] et [17] (voir liste de  
références annexée) pour coupler un oligosaccharides à  
15 un polypeptide sont utilisables dans la présente invention.

Selon la présente invention, pour les raisons évoquées ci-dessus, il est aussi possible d'utiliser tout type d'agent pontant, ou bras espaceur,  
20 se fixant d'une part sur une extrémité de l'oligosaccharide et d'autre part sur une partie de CD4 non essentielle à sa fonction. Le bras espaceur peut être un de ceux précités. Sa préparation peut être réalisée de la manière décrite dans les documents [18]  
25 et [19].

La molécule hybride de la présente invention a un triple intérêt : elle se fixe à la protéine virale gp120 sur le site d'interaction de CD4, sur la boucle V3, lorsque ces gp120 sont issues de virus utilisant  
30 CXCR4 comme co-récepteur, et sur le domaine d'interaction avec les co-récepteurs (domaine CD4i), comme schématisé sur la figure 7 annexée. Elle permet

donc de bloquer simultanément tous les domaines que la gp120 utilise pour interagir avec ses récepteurs et co-récepteurs cellulaires.

5 D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront à l'homme du métier à la lumière des exemples ci-dessous, donnés à titre illustratif et non limitatif, en références aux figures et séquences annexées.

#### 10 Brève description de la liste de séquences

Les séquences IDn°1 à IDn°18 de la liste de séquences annexée sont des exemples non limitatifs de molécules capables d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 au sens de la présente invention. Ces molécules sont des peptides issus du CD4  
15 humain (SeqIDn°1), ou des peptides artificiels issus ou dérivés de peptides de venin de scorpion (SeqIDn°2 à 18).

#### 20 Brève description des figures

- La figure 1 est un graphique représentant la quantité de gp120/CD4, en unités de résonance (RU), fixée sur l'héparine en fonction du temps t (en secondes) pour différentes concentrations de CD4 (en  
25 nM) : courbes de bas en haut : 0 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 nM.

- La figure 2 est un graphique représentant la quantité de gp120/CD4, en unités de résonance (RU), fixée sur l'héparine en fonction de la concentration de  
30 CD4 (en nM).

- La figure 3 est un graphique représentant l'évolution de l'interaction protéine virale

gp120/anticorps 48d (réponse RU) en fonction du temps (en secondes) pour différentes concentrations en peptide CD4 (en nM) : courbes de bas en haut : 0 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 nM.

5 - La figure 4 est un graphique représentant l'inhibition de l'interaction du complexe gp120/CD4 avec l'anticorps 48d (réponse RU) en fonction du temps (en secondes) par différentes concentrations d'héparine H (en nM) : courbes de haut en bas : 0 ; 3 ; 6 ; 12 ;  
10 30 µg/ml.

- La figure 5 est un graphique représentant l'inhibition la quantité de complexes de gp120/CD4 fixés sur 48d en fonction de la taille du fragment d'héparine en degré de polymérisation, de dp 0 à dp 18 (courbes du haut en bas : dp 0; dp 2; dp 4; dp 6; dp 8; dp 10; dp 12; dp 14; dp 16; dp 18).

- La figure 6 est un graphique représentant la quantité de complexes de gp120/CD4 fixés sur 48d en fonction de la taille du fragment d'héparine à partir des données représentées sur la figure 5.

- La figure 7 est un dessin montrant schématiquement la protéine virale gp120, et l'interaction d'une composition conforme au deuxième mode de réalisation de la présente invention avec la protéine virale gp120. Sur cette figure, sCD4bs (« s » pour soluble, et « bs » pour « binding site ») = site de liaison à CD4, V3 = boucle V3, CD4ni = site de liaison au co-récepteur non-induit (« ni ») (non accessible), CD4i = site de liaison au co-récepteur induit par la liaison de CD4 à gp120 (« i » pour induit), CD4/H = molécule hybride peptide CD4/héparine ou héparane sulfate selon le deuxième mode de

réalisation de la présente invention, et H = héparine ou héparane sulfate.

- Les figures 8 a) à h) sont des représentations graphiques de l'interaction de complexes de protéine virale gp120 et gp120/CD4 sur une biopuce de détection activée avec de l'héparine, à différentes concentrations de protéine virale gp120 : 0 nM (a) ; 0,62 nM (b) ; 1,25 nM (c) ; 2,5 nM (d) ; 5 nM (e) ; 10 nM (f), 20 nM (g) et 40 nM (h), avec une préincubation (lignes continues) ou sans préincubation (lignes discontinues) avec 80 nM de CD4 soluble.

- La figure 9 est une représentation graphique de l'inhibition de l'interaction gp120/CD4 par de l'héparine et des oligosaccharides d'héparine (H) sur une biopuce de détection activée par mAb17b. La protéine virale gp120 (5 nM) a été préincubée successivement avec un peptide CD4 (10 nM) et avec des concentrations d'héparine ([H]) à 0 nM (courbe a) ; 2,1 nM (b) ; 4,2 nM (c) ; 8,3 nM (d) ; et 16,7 nM (e), avant d'être injectée sur la surface mAb17b.

- La figure 10 est une représentation graphique de l'inhibition de l'interaction gp120/CD4 par de l'héparine et des oligosaccharides d'héparine (H) sur une biopuce de détection activée par mAb17b. La protéine virale gp120 (5 nM) a été préincubée successivement avec un peptide CD4 (10 nM) et avec une concentration d'héparine de 40 nM, avec différents degrés de polymérisation : dp 0 (courbe 1) ; dp 2 (courbe 2) ; dp 4 (courbe 3) ; dp 6 (courbe 4) ; dp 8 (courbe 5) ; dp 10 (courbe 6) ; dp 12 (courbe 7) ; dp 14 (courbe 8) ; dp 16 (courbe 9) ; dp 18 (courbe 10), avant d'être injectée sur la surface mAb17b.

- La figure 11 représente l'absorbance à 230 nm de différentes fractions (F) de 15 ml obtenues lors d'une synthèse enzymatique d'héparine à des degrés de polymérisation dp allant de 2 à 10 (le dp correspond au  
5 chiffres indiqués sur la courbe).

### EXEMPLES

Dans les exemples suivants, les analyses d'interaction gp120-héparine ont été effectuées par  
10 résonance plasmonique de surface (système BIAcore (marque de commerce)). Cette technique qui permet d'effectuer des mesures d'interaction en temps réel, présente également l'avantage de proposer un modèle proche de la réalité physiologique, où l'héparine  
15 immobilisée sur une biopuce de détection ("sensochip") constitue une interface bidimensionnelle à l'image de la surface cellulaire.

#### Exemple 1 : SYNTHÈSE D'UN PEPTIDE CD4 UTILISABLE POUR 20 FABRIQUER LA COMPOSITION DE LA PRÉSENTE INVENTION

Un peptide de la liste de séquences annexée est synthétisé par synthèse chimique en phase solide avec un synthétiseur automatique de peptides Applied Biosystems, mod. 433A, et en chimie Fmoc, qui utilise  
25 le groupement Fluorenylméthoxycarbone (Fmoc) pour la protection temporaire de la fonction  $\alpha$ -aminique des acides aminés. Les groupements protecteurs utilisés pour prévenir les réactions secondaires des chaînes latérales des acides aminés, dans cette stratégie Fmoc,  
30 ont été le tertio-butyle éther (tBu) pour les résidus Ser, Thr et Tyr ; tertio-butyle ester (OtBu) pour Asp, Glu ; trityle (Trt) pour Gln, Asn, Cys, His ;

tertio-butyloxycarbonyle (Boc) pour Lys et  
2,2,5,7,8-pentaméthylchromane-6-sulfonyl (Pmc) pour  
Arg.

La réaction de couplage se déroule avec un excès  
5 de 10 équivalents d'acides aminés (1 mmol) par rapport  
à la résine (0,1mmol). L'acide aminé protégé est  
dissous dans 1 ml de N-méthylpyrrolidone (NMP) et 1 ml  
d'une solution de 1-N-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt)  
1M dans le solvant NMP. 1 ml d'une solution de  
10 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 1M est alors  
ajouté. Après 40 à 50 minutes d'activation, l'ester  
actif formé est transféré dans le réacteur qui contient  
la résine. Avant cette étape de transfert puis de  
couplage, la résine est déprotégée de son groupement  
15 Fmoc par une solution de 20 % de pipéridine dans le  
NMP. L'excès de pipéridine est enlevé par lavage à la  
NMP après 5 à 10 minutes environ.

Après synthèse du peptide, le peptide-résine est  
traité à 5 reprises avec une solution de 2% d'hydrazine  
20 dans la DMF. Le couplage d'un bras de liaison est  
réalisé pendant une heure à température ambiante dans  
la DMF avec 10 équivalents d'acide Fmoc-8-amino-3,6-  
dioxaoctanoïque utilisant le réactif HBTU en présence  
de diisopropyléthylamine. Le groupement Fmoc est  
25 ensuite déprotégé avec 20% de pipéridine dans la DMF.

Le peptide-résine est dès lors traité avec 10  
équivalents de réactif de Traut (hydrochlorure de 2-  
iminothiolane (Sigma) en présence de DIEA. Le peptide  
est enfin libéré et déprotégé comme décrit ci-dessous.

30 Le clivage de la résine et des groupements  
protecteurs présents sur les chaînes latérales ont été  
réalisés simultanément par traitement du peptide lié à



la résine par de l'acide trifluoroacétique (TFA). Avant d'effectuer le clivage, la résine a été lavée plusieurs fois au dichlorométhane (DCM) et enfin séchée. Le réactif utilisé lors du clivage est un mélange acide  
5 contenant 81,5 % de TFA et les piègeurs phénol (5 %), thioanisole (5 %), eau (5 %), éthanedithiol (2,5 %) et tri-isopropylsilane (1 %). La résine a été traitée avec ce mélange pendant trois heures sous agitation et à température ambiante, à raison de 100 ml de solution  
10 par gramme de résine. Le peptide libre en solution a été récupéré par filtration. Le peptide a été ensuite précipité et lavé à froid dans l'éther de diisopropyle puis dissous dans de l'acide acétique à 20 % et lyophilisée.

15 Le peptide récupéré après lyophilisation, le brut de synthèse, se trouve sous forme réduite, c'est-à-dire que les ponts disulfure intrachâînes ne sont pas formés. La formation de ces liaisons covalentes a été réalisée en utilisant le couple redox  
20 cystamine/cystéamine. Le brut de synthèse a été repris dans l'eau ajoutée de TFA 0,1 % (v/v) et de chlorure de guanidinium 6M pour faciliter sa dissolution, à raison de 2,0 mg.ml<sup>-1</sup>. Cette solution a ensuite été ajoutée au goutte-à-goutte, diluée à 0,2 mg/ml<sup>-1</sup>, au tampon de  
25 réduction, composé de Tris/HCl 100mM, pH 7,8, et de cystéamine 5 mM. La cystamine (oxydant) 0,5 mM en final, a été ajoutée après 45 minutes de réaction à température ambiante. Le milieu est amené à pH 3,0 après 30 minutes.

30 La cystéamine permet de réduire les groupements thiols présents sur le peptide. A l'air libre, elle s'oxyde et permet l'oxydation de cystéines et donc le

repliement du peptide par formation de ponts disulfure intrachaines. La cystamine ajoutée en fin de manipulation permet de parfaire le repliement. Le bon déroulement de l'oxydation est vérifié par chromatographie analytique en comparant les temps de rétention des produits brut et oxydé, plus importants pour le premier.

Les peptides ont été purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur une colonne préparative Vydac C18 (1,0 x 25,0 cm). On a utilisé un gradient linéaire 0-60 % d'acétonitrile dans une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique à 0,1 % pendant 90 minutes. Les fractions du pic majeur ont été analysées par HPLC analytique; les fractions ne présentant qu'un seul pic ont été rassemblées et lyophilisées.

Les produits ainsi obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse. Il s'agit des peptides de la liste de séquence annexée.

20

EXEMPLE 2 : SYNTHÈSE D'UN POLYANION DE TYPE HEPARINE OU HEPARANE SULFATE UTILISABLE POUR LA COMPOSITION DE LA PRESENTE INVENTION

A) Synthèse enzymatique

25

Une molécule d'héparine ou d'héparane sulfate ayant un degré de polymérisation  $dp$  défini est synthétisée.

6 g d'héparine sont solubilisées dans un tampon contenant 5 mM de tris, 2 mM de  $CaCl_2$ , 50 mM de NaCl et 0,1 mg/ml d'albumine. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide acétique. Cette solution est incubée à 25°C,

30

avec de l'héparinase I (8 mU/ml) pendant environ 50 h (la réaction enzymatique est suivie par l'augmentation de la densité optique, mesurée à 232 nm).

Le mélange est ensuite purifié par chromatographie de filtration sur gel. La phase solide est du Biogel P10, contenue dans une colonne de 1,50 m et 4,4 cm de diamètre, éluée à 1 ml/min avec du NaCl 0,25 M.

La figure 11 représente l'absorbance à 230 nm des différentes fractions de 15 ml obtenues pour des degrés de polymérisation dp allant de 2 à 10.

Les différents oligosaccharides (dp2, dp4, ..., etc.) sont dialysés contre de l'eau puis lyophilisés.

#### 15 B) Synthèse par dépolymérisation chimique à partir de produit naturel

Lorsque le matériel de départ est de l'héparine, on procède de la façon suivante : 1 g d'héparine est solubilisé dans 20 ml de sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) à 2,1 mg/ml. La solution est ajustée à pH 1,5 avec de l'acide sulfurique, puis incubée à 4°C pendant 3h. La réaction est arrêtée, et les oligosaccharides sont purifiés comme ci-dessus dans le paragraphe A).

Lorsque le matériel de départ est de l'héparane sulfate, on procède de la façon suivante : 8 g d'héparane sulfate sont solubilisés dans 40 ml contenant 5 mM de tris, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM de NaCl et 0,1 mg/ml d'albumine. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide acétique. Cette solution est incubée à 30°C, avec de l'héparinase III (25 mU/ml) pendant environ 72h. De héparinase III est ajoutée à nouveau, pour une

période de 48h, puis les produits sont purifiés comme décrit ci-dessus dans le paragraphe A).

EXEMPLE 3 : SYNTHÈSE D'UNE COMPOSITION DE LA PRÉSENTE

5 INVENTION : MÉLANGE D'UN PEPTIDE CD4 AVEC UN POLYANION

Dans cet exemple, un peptide CD4 de l'exemple 1 est mélangé avec un héparane sulfate préparé dans l'exemple 2.

10 Ces deux molécules sont mises en solution à une concentration deux fois supérieure à la concentration finale désirée. Ces mises en solutions sont effectuées dans un tampon physiologique. Par exemple PBS, TBS (Tris 50mM, NaCl 0,15M, pH 7,5), ou HBS (Hepes 20mM, NaCl 0,15M, pH 7,5).

15 Les deux préparations sont ensuite mélangées volume à volume (1/1).

EXEMPLE 4 : SYNTHÈSE D'UNE COMPOSITION DE LA PRÉSENTE

INVENTION : COUPLAGE D'UN PEPTIDE CD4 AVEC UN POLYANION

20 Dans cet exemple, un peptide CD4 de l'exemple 1 est couplé avec l'héparane sulfate préparé dans l'exemple 2.

L'héparane sulfate est incubé avec un excès molaire d'hydrazine ou de carbodiimide. Cette étape  
25 a pour fonction de placer un groupe hydrazine sur l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide, lorsque celui-ci est préparé par dépolymérisation enzymatique, ou sur l'aldéhyde de l'oligosaccharide, lorsque celui-ci est préparé par dépolymérisation chimique à l'acide  
30 nitreux.

Les carbohydrates du peptide CD4 soluble sont oxydés par traitement au périodate de sodium, la

fonction aldéhyde ainsi créée est utilisée pour le couplage de l'oligosaccharide hydraziné.

L'oligosaccharide, généralement en solution à 1 mM dans un tampon PBS (phosphate de sodium salin) est  
5 co-incubé avec un excès molaire (par exemple jusqu'à 100 fois) d'hydrazine ou de carbodihydrazide également en solution dans PBS. Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante, puis purifié par dessalage ou dialyse contre de l'eau distillée, et finalement séché  
10 par évaporation sous vide ou lyophilisé.

La molécule de CD4 soluble (sCD4) glycosilée (produite dans des cellules de mammifères ou des cellules d'insectes) est reprise dans un tampon phosphate 20 mM, pH 6,2 puis traitée par du périodate  
15 de sodium (10 mM) pendant 20 minutes, à 4°C et à l'obscurité. Pour éliminer le périodate de sodium, le mélange réactionnel est dessalé par gel filtration ou par dialyse contre le tampon phosphate.

Le sCD4, dont les glycanes sont ainsi oxydés, est  
20 co-incubé avec un excès molaire d'oligosaccharide hydraziné à 4°C, pour former le complexe entre les deux molécules.

Lorsque le CD4 n'est pas glycosilé, on procède de la manière décrite par Najjam et al. dans le document  
25 [17].

Il est aussi possible d'utiliser tout type d'agent pontant se fixant d'une part sur une extrémité de l'oligosaccharide et d'autre part sur une partie du peptide CD4 non essentielle à sa fonction. L'homme du  
30 métier n'aura pas de difficultés à mettre en œuvre ce procédé ou un procédé équivalent.

EXEMPLE 5 : MISE EN EVIDENCE DE L'AUGMENTATION DE  
L'AFFINITE DE gp120 POUR L'HEPARINE PAR CD4

30 unités de résonance (RU) d'héparine biotinylée  
sont immobilisées à la surface d'une biopuce  
5 ("sensorchip" B1 fabriquée par la société Biacore).

gp120 (hxbc2) à 50 nM est incubée pendant 1 heure  
30 min avec des concentrations croissantes de CD4  
soluble à 0, 50, 100, 250 ou 500 nM ; puis injectée sur  
la surface d'héparine à 10 µl/min.

10 Les analyses d'interaction gp120-héparine par  
résonance plasmonique de surface ont été effectuées en  
fonction du temps.

Les courbes de la figure 1 correspondent à  
l'injection de gp120 à 50 nM et de CD4 respectivement à  
15 0, 50, 100, 250 ou 500 nM (respectivement pour les  
courbes de bas en haut sur cette figure).

La figure 2 montre la quantité de gp120/CD4 fixée  
sur l'héparine en fonction de la concentration de CD4.

Il apparaît qu'un rapport molaire de CD4 : gp120  
20 d'environ 5:1 produit la réponse maximum.

Ces résultats montrent que l'exposition du  
domaine CD4i de la gp120 augmente fortement  
l'interaction de gp120 avec l'héparine. CD4i représente  
donc un nouveau site d'interaction avec l'héparine.

25

EXEMPLE 6 : INTERACTION gp120/48D DEPENDENTE DE CD4

1250 RU d'anticorps 48d spécifique de l'épitope  
CD4i sont immobilisées à la surface d'une biopuce  
("sensorchip" B1) comme dans l'exemple 1 ci-dessus.

30 La protéine virale gp120 (hxbc2) à 50 nM est  
incubée pendant 1h20 avec des concentrations

croissantes de CD4 soluble à 0, 50, 100, 250 ou 500 nM ; puis injectée sur la surface 48d à 10  $\mu$ l/min.

Les analyses d'interaction gp120-héparine par résonance plasmonique de surface ont été effectuées en fonction du temps.

Les courbes de la figure 3 correspondent à l'injection de gp120 à 50 nM et de CD4 respectivement à 0, 50, 100, 250 ou 500 nM (respectivement pour les courbes de bas en haut sur cette figure).

Cet exemple montre que l'interaction gp120/48d dépend de CD4, et que 48d interagit avec CD4i, le domaine de reconnaissance des co-récepteurs. Cet anticorps peut donc être utilisé comme modèle de l'interaction de gp120 avec un co-récepteur.

15

EXEMPLE 7 : INHIBITION DE L'INTERACTION PROTEINE gp120 - 48d PAR L'HEPARINE

La protéine gp120 est co-incubée pendant 40 minutes avec CD4. Le mélange est ensuite divisé en 5 aliquots dans lesquels est ajoutée l'héparine (15 kDa) à différentes concentrations.

Les concentrations finales dans les aliquotes sont : gp120 : 50 nM ; CD4 : 250 nM et héparine : 0, 3, 6, 12 ou 30  $\mu$ g/ml respectivement du haut en bas sur la figure 4. Sur la courbe du haut, pas d'héparine, on visualise l'interaction gp120/CD4, toutes les autres courbes sont en présence d'héparine (de 3 à 30  $\mu$ g/ml respectivement du haut en bas, figure 4).

Après 40 minutes d'incubation, les différents mélanges sont injectés sur la surface 48d.

Les analyses d'interaction gp120-héparine par résonance plasmonique de surface ont été effectuées en fonction du temps.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4. Ils montrent que l'héparine inhibe l'adsorption du complexe gp120/CD4 sur la surface d'anticorps 48d. L'héparine s'avère d'ailleurs être un inhibiteur efficace puisque l'inhibition est pratiquement complète dès la plus faible des concentrations testées (3 µg/ml).

Ceci montre que l'héparine entre en compétition avec 48d et se fixe donc sur CD4i.

Cet exemple indique que l'activité inhibitrice des oligosaccharides (héparine), tels que définis ci-dessus, est obtenue en présence de CD4.

Ce résultat permet de proposer l'utilisation d'une molécule hybride composé de CD4 et d'oligosaccharides de type héparine, liés de façon covalente ou d'un mélange de ces deux molécules.

L'interaction directe du domaine CD4i avec un polyanion n'a jamais été décrite dans l'art antérieur, de même que l'inhibition de l'interaction gp120-anticorps 48d par un polyanion. Il n'existait pas de travaux montrant l'inhibition possible de gp120 avec les co-récepteurs par une molécule de type héparine.

#### Exemple 8 : INHIBITION DE L'INTERACTION gp120-48d PAR DES FRAGMENTS OLIGOSACCHARIDES DE TAILLES DEFINIES

Les fragments oligosaccharides de tailles définies sont obtenus par dépolymérisation enzymatique.

La protéine virale gp120 est co-incubée pendant 60 minutes avec CD4 de façon à exposer le domaine CD4i.



Le mélange est réparti en 8 aliquots et des fragments d'héparine de taille croissante, comprenant de 1 à 8 motifs disaccharides de base, soit un degré de polymérisation (dp) de 2 à 16, sont ajoutés pour donner des concentrations finales de 50 nM pour gp120, 250 nM pour CD4 et 125 nM pour les fragments d'héparine (la masse moléculaire d'un disaccharide est d'environ 600 Da.

Les mélanges sont ensuite injectés sur la surface 48d (figure 5). Les données obtenues permettent de représenter la quantité de complexes de gp120/CD4 fixés sur 48d en fonction de la taille du fragment d'héparine (figure 6).

Ces résultats montrent que des oligosaccharides de taille égale ou inférieure à dp6 (3 disaccharides) n'ont pas la capacité de bloquer l'interaction du complexe gp120/CD4 avec 48d.

En revanche, l'interaction est complètement inhibée par les fragments dont la taille est supérieure à dp 10 et mieux encore à dp12, à la concentration testée.

Ces résultats révèlent par exemple qu'une concentration de 125 nM d'héparine ayant un degré de polymérisation égal à 16 (dp16), soit 0,6µg/ml, en présence de CD4 à 250 nM, inhibe 90 à 100% de l'interaction de l'anticorps 48d à la gp120 (50 nM), ce qui confirme l'existence d'une interaction directe. De même, des oligosaccharides d'héparine de type dp14 à dp18 à 40 nM, inhibent l'interaction du complexe gp120 (5 nM)/CD4 (10 nM) avec l'anticorps 17b.

Ces résultats montrent que l'héparine, une molécule de structure très voisine des héparanes

sulfates, interagit également avec un deuxième site de fixation sur la gp120. Ce site nommé CD4i, est un épitope uniquement exposé lorsque gp120 interagit avec CD4, qui constitue le site de fixation des co-récepteurs du VIH. Ces résultats montrent que la présence de CD4 qui a pour effet d'exposer le site CD4i augmente de façon très considérable l'interaction gp120-héparine ou gp120-héparane sulfate : ceci n'a jamais été décrit par ailleurs et constitue la première preuve d'une interaction possible entre gp120 et héparine ou héparane sulfate par l'intermédiaire du site CD4i.

Une étude en modélisation moléculaire a montré que le site CD4i de la gp120 est constitué d'acides aminés basiques. Ces résidus basiques sont alignés sur la surface de la protéine, et constituent effectivement un site d'interaction avec l'héparine, ou des oligosaccharides dérivés d'héparine ou d'héparane sulfate.

Les inventeurs proposent donc par la présente une utilisation thérapeutique des composés poly-anioniques ciblant ce nouveau site d'interaction. L'approche consiste en l'utilisation conjuguée de polyanions et de molécules capables d'exposer l'épitope CD4i, en co-administration ou sous la forme d'une molécule hybride. Ce type de molécule bloque simultanément tous les domaines d'interaction de la gp120 avec les cellules hôtes.

### Références bibliographiques

[1] Chan D.C., Kim P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* **93** : 681-684.

5

[2] Claphan P.R. 1997 HIV and chemokines : ligands cell surface receptors. *Trends in cell biol.* **7** : 264-268.

10 [3] Michael N.L., Moore J.P. (1999), HIV entry inhibitors : evading the tissue, *Nat Med* **5** : 740-2.

[4] Chan D.C. Chutkowski C.T. Kim PS. (1998), Evidence that a prominent cavity in the coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target, *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 15613-7.

[5] Doms R.W., Moore J.P. (2000), HIV-1 membrane fusion : targets of opportunity. *J. Cell Biol* **151** : F9-14.

[6] Schenten D. Marcon L, Karlsson GB, Parolin C, Kodama T, Gerard N, Sodroski J. (1999), Effect of soluble CD4 on simian immunodeficiency virus infection of Cd4-positive and CD4-negative cells, *J Virol.* **73** : 5373-80.

[7] Chen J.D., Bai X., Yang A.G. Cong Y., Chen S.Y. (1997), Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nat Med* **3** : 1110-6.

30

- [8] Oberlin E., Amara A. Bachelier F. Bessia C., Virelizier JL, Arenza-Seisdedos F., Schwartz O., Heard J.M., Clark-Lewis I., Legler D.F., Loetscher M. Baggiolini M., Moser B., (1996), The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusion and prevent infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382** : 833-5.
- [9] Proudfoot A.E., Wells T.N., Clapham P.R., (1999) Chemokine receptors-future therapeutic targets for HIV ? *Biochem Pharmacol.* **57**:451-63.
- [10] Muramaki T., Nakajima T., Koyanagi Y., Tachibana K., Fujii N., Tamamura H., Yoshida N., Waki M., Matsumoto A., Yoshie O., Kishimoto T., Yamamoto N., Nagasawa T., (1997), A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* **186**:1389-93.
- [11] Mondor I., Ugolini S., Sattentau Q.J., (1998) : "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment to HeLa CD4 Cells Is Independent and gp120 Dependent and Requires Cell Surface Heparans", *J. Virol.* **72** : 3623-34.
- [12] Roderiquez G., Oravec T., Yanagishita M., Bou-Habib D.C., Mostowski H., Norcross M.A., (1995) : "Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interactions of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41", *J. Virol.* **69** : 2233-9.

[13] Abrams D.I., Kuno S., Wong R., Jeffords K., Nash M., Molaghan J.B., Gorter R., Uenor R., (1989) : "Oral dextran sulfate (UA001) in the treatment of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex", *Ann. Intern. Med.* **110** : 183-8.

[14] Flexner C., Barditch-Crovo P.A., Kornhauser D.M., Farzadegan H., Nerhood L.J., Chaisson R.E., Bell K.M., Lorentsen K.J., Hendrix C.W., Petty B.G., Lietman P.S., (1991) : Pharmacokinetics, toxicity, and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection", *Antimicrob. Agents Chemother.* **335** : 2544-50.

[15] Chernyak A, Karavanov A, Ogawa Y, Kovac P, Conjugating oligosaccharides to proteins by squaric acid diester chemistry : rapid monitoring of the progress of conjugation, and recovery of the unused ligand, *Carbohydr. Res.* **2001**, **330**(4):479-486.

[16] Kuberan B, Gunay NS, Dordick JS, Linhardt RJ, Preparation and isolation of neoglycoconjugates using biotin-streptavidin complexes, *Glycoconj. J* **1999**, **16**(6):271-281.

[17] Najjam S, Gibbs RV, Gordon MY, Rider CC, Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach, *Cytokine* **1997**, **9**(12):1013-1022).

[18] Dreef-Tromp CM, Basten JE, Broekhoven MA, Van  
Dinther TG, Petitou M, Van Boeckel CA, Biological  
properties of synthetic glycoconjugate mimics of  
heparin comprising different molecular spacers, *Bioorg.*  
5 *Med. Chem. Lett.* 1998, 8-16 : 2081-2086.

[19] Grootenhuis PD, Westerduin P, Meuleman D, Petitou  
M, Van Boeckel CA, Rational design of synthetic heparin  
analogues with tailor-made coagulation factor inhibitor  
10 activity, *Nat. Struct. Biol.* 1995, 2(9) : 736-739.

**REVENDICATIONS**

1. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un polyanion et une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le polyanion est choisi dans le groupe constitué de l'héparine, de l'héparane sulfate, et d'un polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate.

3. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 10 à 24.

4. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 12 à 20.

5. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 15 à 17.

6. Composition selon la revendication 1, dans laquelle molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 est un peptide CD4 ou un dérivé de ce peptide.

## REVENDICATIONS

1. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un polyanion et une molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 choisie parmi un peptide CD4 ou un dérivé de ce peptide, ou encore un anticorps monoclonal se fixant sur la protéine virale gp120 et capable d'activer ladite protéine gp120 de façon équivalente au peptide CD4.
2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le polyanion est choisi dans le groupe constitué de l'héparine, de l'héparane sulfate, et d'un polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate.
3. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 10 à 24.
4. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 12 à 20.
5. Composition selon la revendication 2, dans laquelle l'héparine, l'héparane sulfate ou le polyanion équivalent à l'héparine ou à l'héparane sulfate a un degré de polymérisation dp de 15 à 17.



7. Composition selon la revendication 6, dans laquelle le peptide CD4 est de séquence (I) suivante :

5 Cys ou TPA - P<sup>1</sup>- Cys - P<sup>2</sup> - Cys - P<sup>3</sup> - Cys - Ala ou  
Gln - Gly ou (D)Asp ou Ser - Ser ou His ou Asn -  
Xaa<sup>j</sup> - Cys - Thr ou Ala - Cys- Xaa<sup>k</sup> - NH<sub>2</sub>

10 dans laquelle TPA représente l'acide  
thiopropionique, Xaa<sup>j</sup> représente la β-napthylalanine,  
la phénylalanine ou la bi-phénylalanine, Xaa<sup>k</sup>  
représente Gly, Val ou Ileu, P<sup>1</sup> représente 3 à 6 acides  
aminés, P<sup>2</sup> représente 2 à 4 acides aminés et P<sup>3</sup>  
15 représente 6 à 10 acides aminés, les acides aminés dans  
P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> étant naturels ou non naturels, identiques  
ou différents et P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> ayant ou non une séquence  
commune, ledit peptide présentant une conformation en  
épingle à cheveux β dont le coude β est formé par les  
résidus acides aminés Ala ou Gln - Gly ou DAsp ou  
20 Ser-Ser ou His ou Asn- Xaa<sup>j</sup> de sa séquence (A).

8. Composition selon la revendication 6, dans laquelle le peptide CD4 est choisi parmi les séquences IDn°1 à IDn°18 de la liste de séquences annexée.

25

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans  
30 ladite composition.

6. Composition selon la revendication 1, dans laquelle le peptide CD4 est de séquence (I) suivante :

5

Cys ou TPA - P<sup>1</sup>- Cys - P<sup>2</sup> - Cys - P<sup>3</sup> - Cys - Ala ou  
Gln - Gly ou (D)Asp ou Ser - Ser ou His ou Asn -  
Xaa<sup>j</sup> - Cys - Thr ou Ala - Cys- Xaa<sup>k</sup> - NH<sub>2</sub>

10 dans laquelle TPA représente l'acide  
thiopropionique, Xaa<sup>j</sup> représente la β-napthylalanine,  
la phénylalanine ou la bi-phénylalanine, Xaa<sup>k</sup>  
représente Gly, Val ou Ileu, P<sup>1</sup> représente 3 à 6 acides  
15 aminés, P<sup>2</sup> représente 2 à 4 acides aminés et P<sup>3</sup>  
représente 6 à 10 acides aminés, les acides aminés dans  
P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> étant naturels ou non naturels, identiques  
ou différents et P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> et P<sup>3</sup> ayant ou non une séquence  
commune, ledit peptide présentant une conformation en  
épingle à cheveux β dont le coude β est formé par les  
20 résidus acides aminés Ala ou Gln - Gly ou DAsp ou  
Ser-Ser ou His ou Asn- Xaa<sup>j</sup> de sa séquence (A).

7. Composition selon la revendication 1, dans  
laquelle le peptide CD4 est choisi parmi les séquences  
25 IDn°1 à IDn°18 de la liste de séquences annexée.

8. Composition selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 7, dans laquelle le polyanion et la  
molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope  
30 CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans  
ladite composition.

10. Composition selon la revendication 9, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition en des proportions de 1 à 10 mole(s) de polyanion pour 0,5 à 1,5 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

11. Composition selon la revendication 8, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition en des proportions de 5 moles de polyanion pour 1 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux dans ladite composition.

13. Composition selon la revendication 12, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux au niveau d'une des extrémités du polyanion.

14. Composition selon la revendication 12, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale

9. Composition selon la revendication 8, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition en des proportions de 1 à 10 mole(s) de polyanion pour 0,5 à 1,5 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

10. Composition selon la revendication 7, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont mélangés dans ladite composition en des proportions de 5 moles de polyanion pour 1 mole de molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux dans ladite composition.

12. Composition selon la revendication 11, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 sont liés entre eux au niveau d'une des extrémités du polyanion.

13. Composition selon la revendication 11, dans laquelle le polyanion et la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale

gp120 sont liés entre eux au moyen d'un bras espaceur de type polyéthylène glycol.

14. Procédé de fabrication d'une composition  
5 selon la revendication 9, comprenant les étapes suivantes :

- préparation du polyanion,
- préparation de la molécule capable  
d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine  
10 virale gp120,
- mélange du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

15

15. Procédé de fabrication d'une composition  
selon la revendication 12, comprenant les étapes  
suivantes :

- préparation du polyanion,
- 20 - préparation de la molécule capable  
d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120,
- liaison du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la  
25 protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir  
ladite composition.

16. Procédé de fabrication selon la revendication  
14 ou 15, dans lequel le polyanion est préparé par  
30 dépolymérisation partielle d'héparine ou d'héparane  
sulfate par une méthode enzymatique ou chimique.

gp120 sont liés entre eux au moyen d'un bras espaceur de type polyéthylène glycol.

14. Procédé de fabrication d'une composition  
5 selon la revendication 8, comprenant les étapes suivantes :

- préparation du polyanion,
- préparation de la molécule capable  
d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine  
10 virale gp120,
- mélange du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

15

15. Procédé de fabrication d'une composition selon la revendication 11, comprenant les étapes suivantes :

- préparation du polyanion,
- 20 - préparation de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120,
- liaison du polyanion et de la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la  
25 protéine virale gp120 préparés de manière à obtenir ladite composition.

16. Procédé de fabrication selon la revendication 14 ou 15, dans lequel le polyanion est préparé par  
30 dépolymérisation partielle d'héparine ou d'héparane sulfate par une méthode enzymatique ou chimique.

17. Procédé de fabrication selon la revendication 14 ou 15, dans lequel la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 étant un peptide, celui-ci est préparé par  
5 synthèse chimique en phase solide ou par recombinaison génétique.

18. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la préparation  
10 d'un médicament.

19. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du sida.  
15

17. Procédé de fabrication selon la revendication 14 ou 15, dans lequel la molécule capable d'induire l'exposition de l'épitope CD4i de la protéine virale gp120 étant un peptide, celui-ci est préparé par  
5 synthèse chimique en phase solide ou par recombinaison génétique.

18. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation  
10 d'un médicament.

19. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du sida.



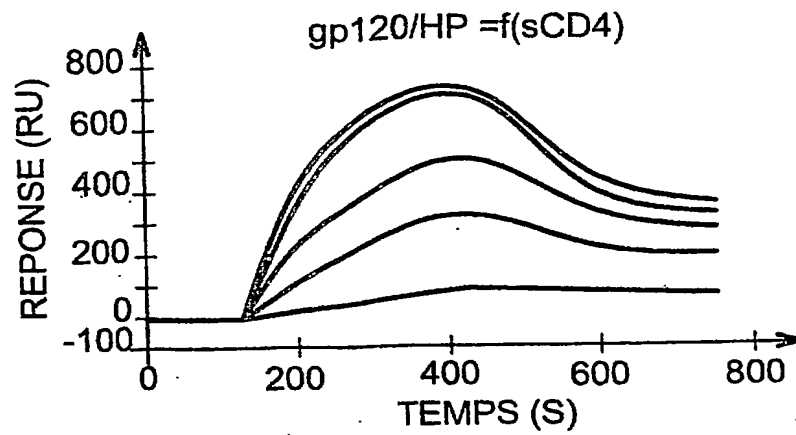


FIG. 1

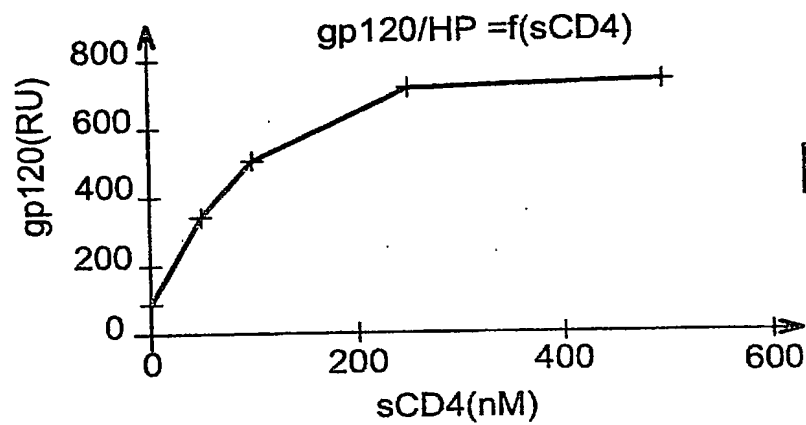


FIG. 2

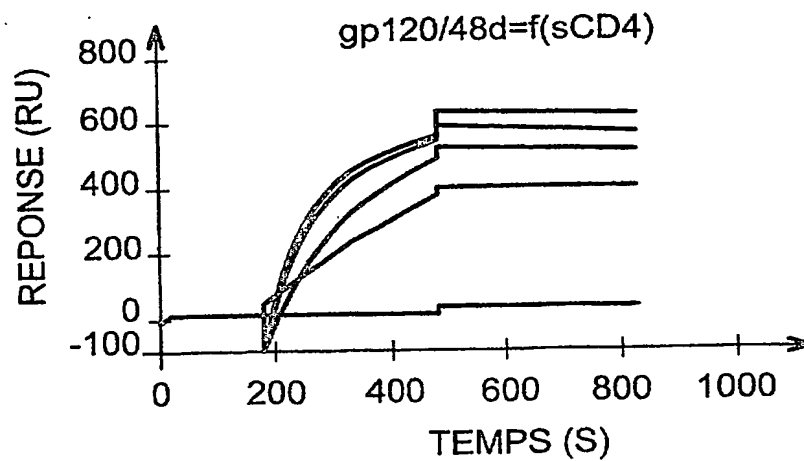


FIG. 3

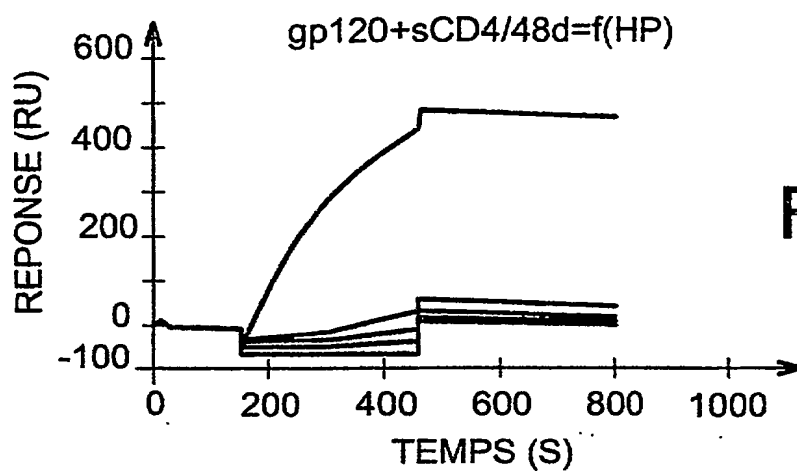


FIG. 4

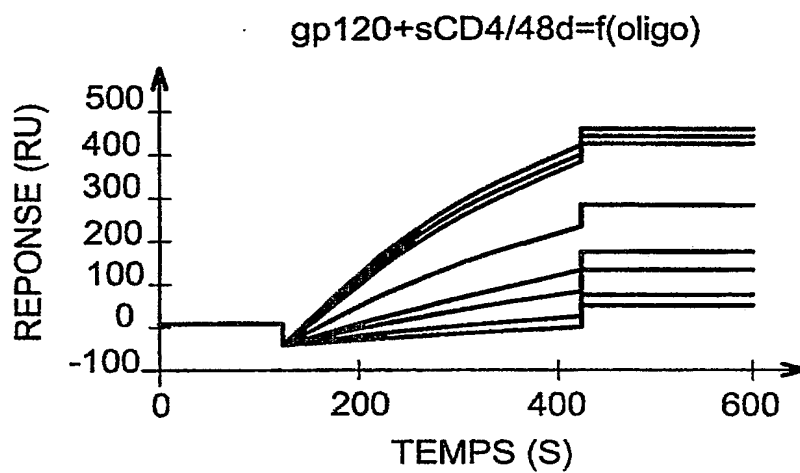


FIG. 5

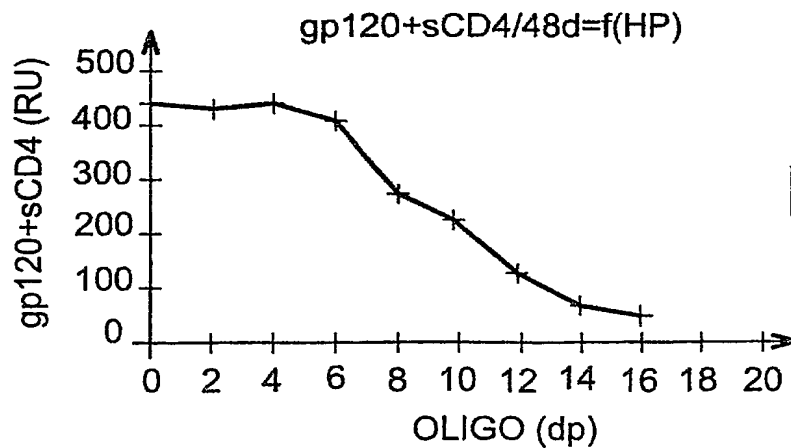


FIG. 6

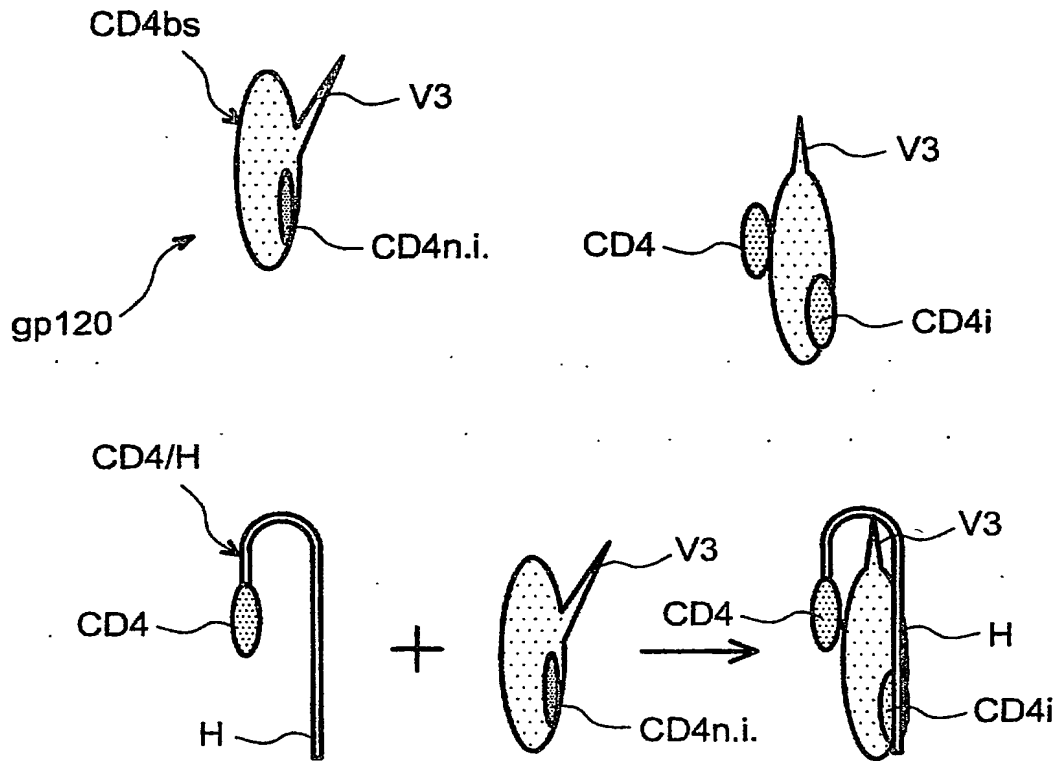


FIG. 7

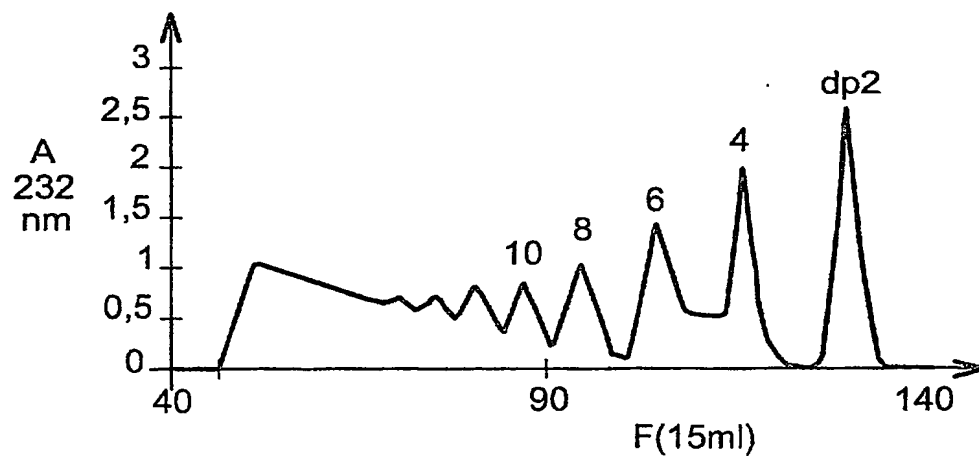


FIG. 11

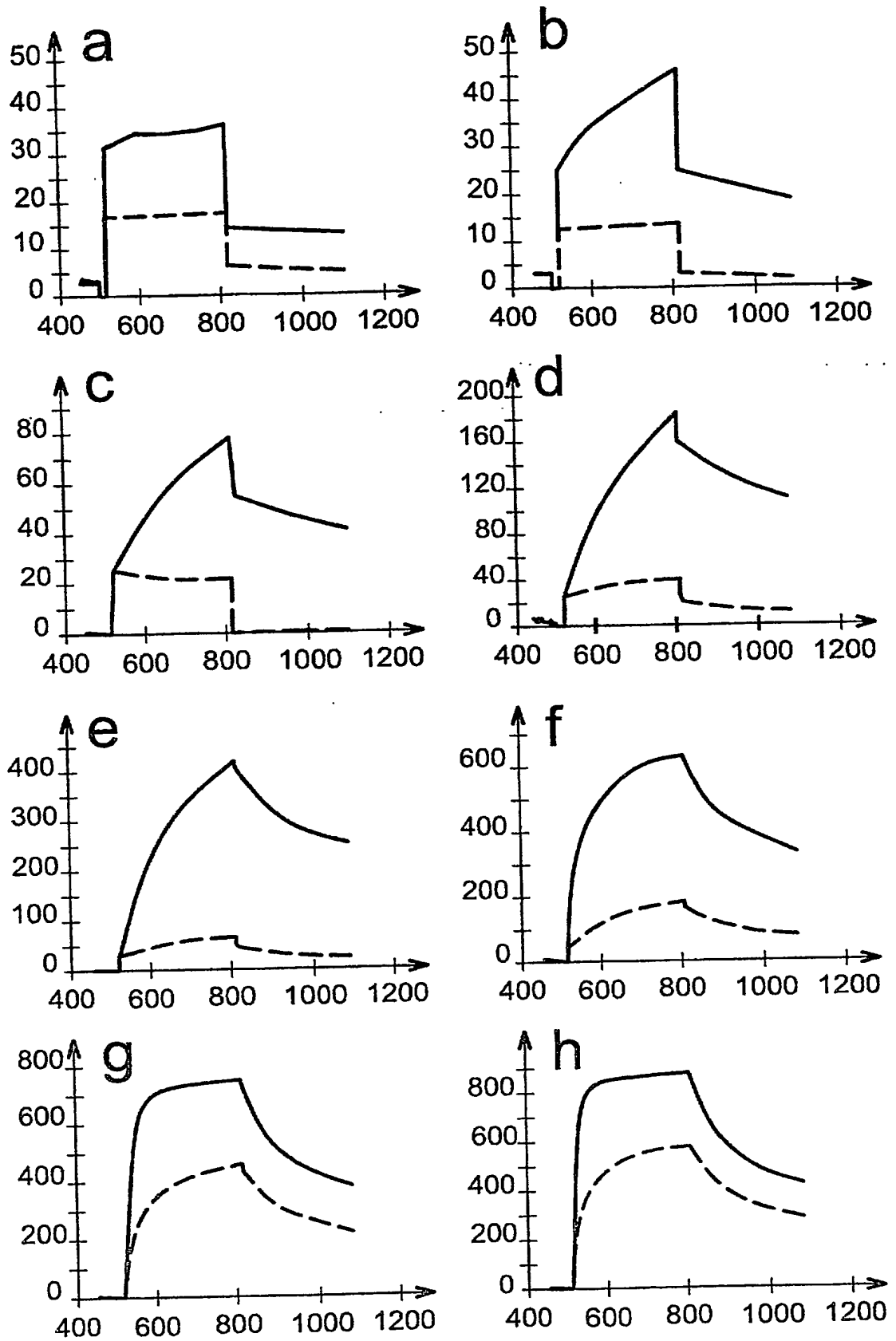


FIG. 8

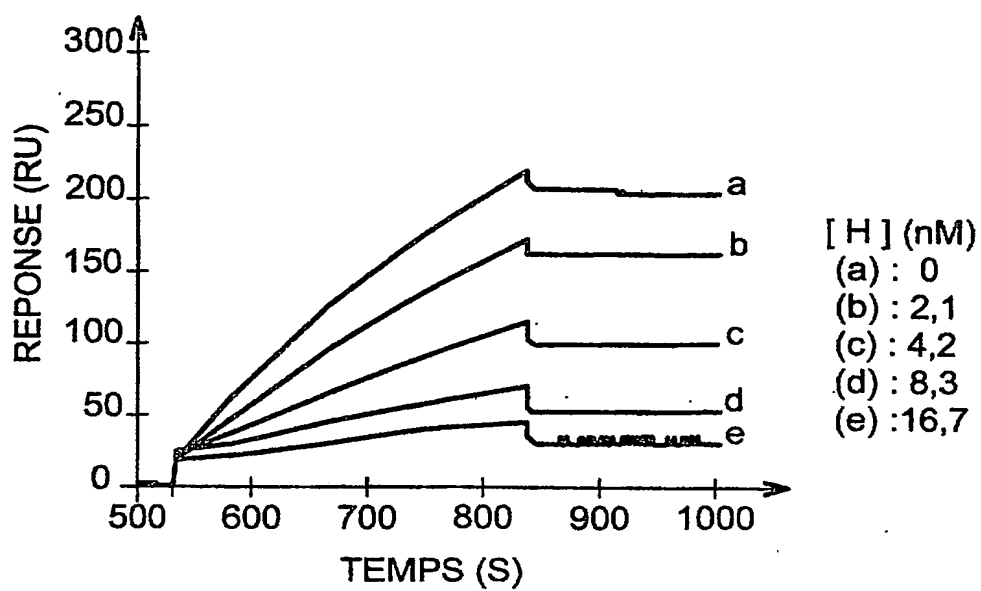


FIG. 9

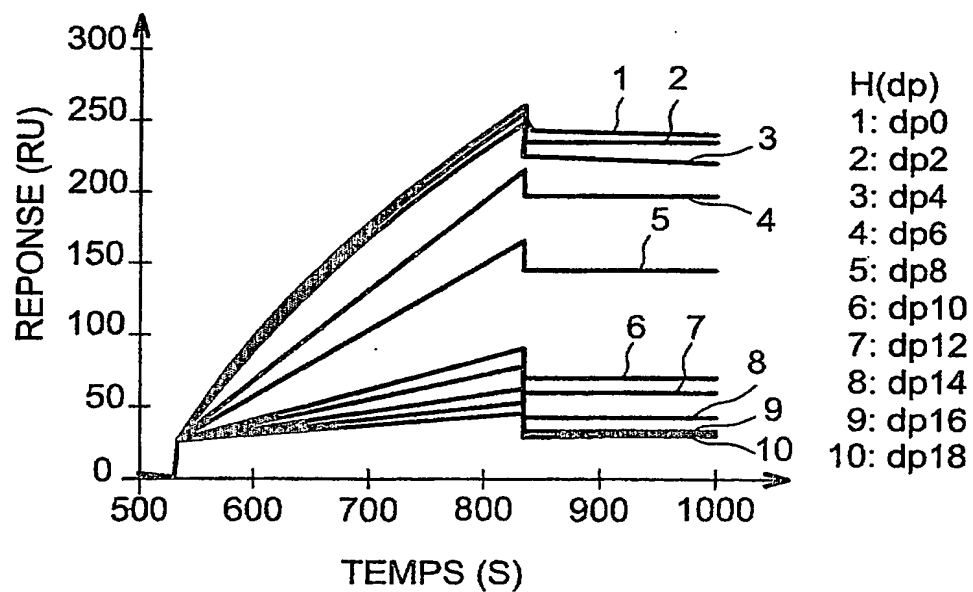


FIG. 10

# LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET  
MEDICAMENT

<130> B13987.3 EE

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Séquence Gln33 à Pro48 du CD4 humain

<400> 1

Gln	Ile	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Gln	Gly	Ser	Phe	Leu	Thr	Lys	Gly	Pro
1				5				10					15		

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> scorpion

<400> 2

Ala	Phe	Cys	Asn	Leu	Arg	Met	Cys	Gln	Leu	Ser	Cys	Arg	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		

Leu	Leu	Gly	Lys	Cys	Ile	Gly	Asp	Lys	Cys	Glu	Cys	Val	Lys	His
			20					25					30	

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<400> 3

Cys	Asn	Leu	Ala	Arg	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5				10					15		

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Phe	Cys	Ala	Cys	Gly	Pro
	20						25				

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 4

Xaa	Asn	Leu	Ala	Arg	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5				10					15		

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Phe	Cys	Ala	Cys	Gly	Pro
	20						25				

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)

<223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 5

Xaa Asn Leu His Phe Cys Val Gln Arg Cys His Ser Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val  
20 25

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 6

Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Ser Phe Cys Ala Cys Val  
20 25

<210> 7

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 7

Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Ser Ser Phe Cys Ala Cys Val  
20 25



<210> 8  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>  
<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 8  
Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly His Phe Cys Ala Cys Val  
20 25

<210> 9  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>  
<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 9  
Xaa Asn Leu Ala Phe Cys Gln Leu Arg Cys Lys Ser Leu Gly Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ala Gly Asn Phe Cys Ala Cys Val  
20 25

<210> 10  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)

<223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 10

Xaa	Asn	Leu	Gln	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5				10					15		

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Xaa	Cys	Ala	Cys	Val
			20					25		

<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)

<223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 11

Xaa	Asn	Leu	His	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5				10					15		

Gly	Lys	Cys	Gln	Gly	Ser	Xaa	Cys	Thr	Cys	Val
			20					25		

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)

<223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 12

Xaa	Asn	Leu	Ala	Arg	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Xaa	Cys	Ala	Cys	Val
			20						25	

<210> 13

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)

<223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 13

Xaa	Asn	Leu	His	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Xaa	Cys	Ala	Cys	Val
			20						25	

<210> 14

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)

<223> bi-phénylalanine ou naphtylalanine

<400> 14

Xaa	Asn	Leu	His	Phe	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu
1				5				10					15		

Gly	Lys	Cys	Ala	Xaa	Ser	Xaa	Cys	Ala	Cys	Ile
			20				25			

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 15

Xaa	Asn	Leu	His	Phe	Cys	Val	Gln	Arg	Cys	His	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu
1				5				10					15		

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Phe	Cys	Ala	Cys	Val
			20				25			

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence

issue de la scyllatoxine

<220>

<223> Xaa = Cys ou acide thiopropionique

<400> 16

Xaa	Asn	Leu	His	Phe	Cys	Val	Gln	Arg	Cys	His	Ser	Leu	Gly	Leu	Lys
1				5					10					15	

Gly	Lys	Cys	Ala	Gly	Ser	Phe	Cys	Ala	Cys	Val
			20					25		

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la scyllatoxine

<400> 17

Cys	Asn	Leu	Ala	Arg	Cys	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu	Lys
1				5					10					15	

Gly	Gly	Cys	Gln	Gly	Ser	Phe	Cys	Thr	Cys	Gly
			20					25		

<210> 18

<211> 33

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
issue de la charybdotoxine

<400> 18

Val	Ser	Cys	Thr	Thr	Ser	Lys	Glu	Cys	Trp	Ser	Val	Cys	Gln	Arg	Leu
1				5					10					15	

His	Asn	Thr	Ser	Lys	Gly	Gly	Cys	Gln	Gly	Ser	Phe	Cys	Thr	Cys	Gly
				20					25					30	

Pro

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B13987.3/EE BD1388/CNRS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02.04926 du 19.04.2002	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET MEDICAMENT.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3 rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		VIVES	
Prénoms		Romain	
Adresse	Rue	Le Champ du Prot	
	Code postal et ville	38210	LA RIVIERE France
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		SATTENTAU	
Prénoms		Quentin	
Adresse	Rue	19 East Street	
	Code postal et ville		OXFORD OX2 OAU Grande Bretagne
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VITA	
Prénoms		Claudio	
Adresse	Rue	28 allée du bois de Graville	
	Code postal et ville	91190	GIF SUR YVETTE France
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 10 JUIN 2002 P. AUDIER 422-5/002			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B13987.3/EE BD1388/CNRS	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02.04926 du 19.04.2002	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) COMPOSITION ANTI-VIH, PROCEDE DE FABRICATION ET MEDICAMENT.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3 rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LORTAT-JACOB	
Prénoms		Hugues	
Adresse	Rue	105, chemin du Crêt de Chaume	
	Code postal et ville	38330	SAINT ISMIER France
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 10 JUIN 2002 P. AUDIER 422-5/002			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**